

偏性嫌気性細菌 *Selenomonas ruminantium* のリジン 脱炭酸酵素に関する研究

著者	塚 由美子
号	629
発行年	1999
URL	http://hdl.handle.net/10097/15976

氏 名(本籍)	たか 高	つか 塚	ゆ み こ 由 美 子
学 位 の 種 類	博	士	(農 学)
学 位 記 番 号	農	博	第 6 2 9 号
学位授与年月日	平	成	12 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
研 究 科 専 攻	東北大学大学院農学研究科農芸化学専攻 (博士課程)		
学位論文題目	偏性嫌気性細菌 <i>Selenomonas ruminantium</i> のリジン 脱炭酸酵素に関する研究		
論文審査委員	(主 査)	教 授	神 尾 好 是
		教 授	勝 亦 瞭 一
		教 授	山 谷 知 行

論文内容要旨

序 論

ポリアミンは、すべての生体内に存在する1級または2級アミノ基を2個以上有する、低分子の脂肪族アミン類の総称である。代表的なポリアミンであるブトレシン、スペルミジン、およびスペルミンは、核酸やタンパク質合成の促進作用および酵素活性の調節作用を持ち、細胞の成長や発生・分化に必須であることが明らかとなっている。カダベリンは最も単純なポリアミンの一種であるが、動物細胞では見出されないことや、原核細胞においても酸性条件下で誘導的に合成される事実から単に pH 調節に関与する物質であるとされ、上記3種類のポリアミンと比較してほとんど研究がなされていなかった。

ところが Kamio らにより、*Selenomonas ruminantium* (1981 年) や *Veillonella* (1987 年) および数種のルーメン細菌のペプチドグリカンにカダベリンが共有結合して存在していることが見出され、その特異な生理機能が注目されるようになった。*S. ruminantium* は、綿羊のルーメン内から単離されたグラム陰性の偏性嫌気性細菌であるが、外膜および内膜を構成する主リン脂質がプラスマロゲンとなっているなど、特徴的な表層膜構造を有することが Kamio らにより報告されている。一般のグラム陰性菌のペプチドグリカン層にはムレインリポタンパク質が結合しており、外膜を細胞壁につなぎとめて安定化している。ところが *S. ruminantium* はムレインリポタンパク質を欠損しており、これに替わるかのように、ペプチドグリカンの D-グルタミン酸残基の α -カルボキシル基はすべて、共有結合したカダベリンにより飽和されている (Fig. 1)。カダベリン合成阻害剤を用いた研究から、本菌におけるペプチドグリカン結合カダベリンの存在は細胞分裂にも関与していることが明らかにされ、大腸菌や他のグラム陰性菌に見られるリポタンパク質関与のものとはかなり異なった、細胞表層膜上でポリアミン特有の本質的意義を持っていると考えられる。

S. ruminantium において、カダベリンを供給しているのがリジン脱炭酸酵素 (LDC) (EC 4. 1. 1. 18) である。一般の細菌の LDC は酸性条件やリジンによる誘導酵素であるのに対し、*S. ruminantium* の LDC は構成的な酵素であり、本菌の正常な生育に不可欠である。本研究室において本酵素が精製され、諸性質が解明されたところ、既知の細菌の誘導型 LDC とは異なる次のような特徴を有することが判明した。(1) 本酵素は分子量 43 K のサブユニットの二量体として存在しており、既知の誘導型 (大腸菌では分子量 78 K のサブユニットの十量体) とは異なった物理化学的性質を持っている。(2) 決定された 24 残基の N 末端アミノ酸配列が、既知の細菌の LDC とは全く異なっている。さらに興味深いことに、(3) 本酵素は L-リジンだけでなく L-オルニチンも基質として認識し、反応産物としてブトレシンを生成することが確認された (Fig. 2)。一般にアミノ酸脱炭酸酵素の基質特異性は高く、リジンとオルニチンの炭素数 1 つの差を厳密に識別している。現在までに本酵素のように 2 つのアミノ酸に同程度に作用する酵素の報告はない。これらの特徴から、本 LDC は他の細菌のものとは進化的な起源が異なる新規の酵素であることが期待された。

本博士論文では *S. ruminantium* の LDC の遺伝子をクローン化し、本酵素の一次構造を明らかにした。その結果、本酵素は真核生物のオルニチン脱炭酸酵素 (ODC) と約 60% の相同性を有

し、既知の細菌の LDC や ODC とは全く相同性を示さないことが判明した。さらに、真核生物の ODC の基質認識はオルニチン特異的であることから、本酵素の 2 つのアミノ酸を認識する機能と構造との関係について、変異酵素を作製して解析を行った。また、本菌の生育に伴って起こる LDC 活性の厳密な発現調節について検討を行った。

第 1 章 *S. ruminantium* の生育に伴う LDC 活性の発現調節

本菌の LDC 活性の発現は、菌体の生育とともに厳密な調節を受けており、生育の定常期初期において活性の急激な低下が起こる。本章では、この制御が転写レベルで起こっているのか、それともタンパク質レベルであるのかを検討した。

S. ruminantium を 37℃、嫌気条件下、グルコースを炭素源とする培地で培養し、菌体の生育と LDC 活性を測定した。また、LDC の mRNA 量とタンパク質量の経時的な変動をそれぞれノーザンおよびウエスタンブロッティングにより解析した (Fig. 3)。対数増殖期において LDC 活性は菌体の生育とともに上昇し、培養 4.5 時間後に最大に達した。その後、菌体の生育が定常期に入ると活性は急激に減少し、培養 7 時間後には完全に消失した。LDC mRNA 量は 4 時間後に、タンパク質量は 4.5 時間後にそれぞれ最大となり、どちらもその後減少していた。しかし mRNA 量は 5 時間後以降に最大時の約 29% で一定になるのに対し、タンパク質は 7 時間後にはまったく検出できなくなった。このことから、定常期初期に起こる LDC 活性の消失は、タンパク質の速やかな分解に起因することが明らかとなった。また、転写レベルにおいても負の制御機構が働いていると考えられる。

菌体当たりの LDC タンパク質量と活性の変動を解析した結果 (Fig. 4)、タンパク質は対数増殖期中期 (3.5 時間後) までに菌体内に蓄積してゆき、その後ゆっくりと減少したのち 4.5 時間後を境に活性と共に急激な減少が起こっていた。対数増殖期の間 LDC により生成したカダベリンは、構成成分としてペプチドグリカンにとり込まれていく。しかし、定常期に入る 4.5 ~ 5 時間後にはペプチドグリカンの α -カルボキシル基はカダベリンで飽和し、過剰となった遊離のカダベリンが菌体内に蓄積すると考えられる。この遊離のカダベリンの蓄積により何らかの負の調節因子が誘導され、急激な LDC タンパク質の分解が引き起こされている可能性がある。

第 3 章で本酵素の一次構造が真核生物の ODC と類似していることが明らかとなるが、マウスの ODC では酵素反応産物であるポリアミンによって誘導される調節タンパク質、アンチザイムを介した分解調節機構が解明されている。本菌においてもアンチザイム様調節タンパク質の存在が予想され、その探索も含めた LDC 制御機構の解明が今後の課題である。

第 2 章 LDC の精製とアミノ酸配列の分析

本章では、本酵素のアミノ酸配列の情報を得るために酵素タンパク質の精製を行った。この際、従来の煩雑な精製法に改良を加え、菌体内含量が 0.06% 未満と大変低い上に、不安定で失活

しやすい本酵素を、従来の2倍の収量で得られる新しい精製法を確立した。

2-1 LDC の精製

精製法の改良は、疎水クロマトグラフィーを基本として試みた。菌体のフレンチプレス破碎液の上清を回収し、Butyl-Toyopearl、Phenyl-5PW、DEAE-5PW、HA-1000 を用いたカラムクロマトグラフィーを行い、60 l の培養液 (125.7 g 湿菌体) から、総活性 54.3 nkat、350 µg の精製酵素標品を得た (Table 1 および Fig. 5)。最初の2段階の疎水クロマトグラフィーで比活性が302倍に上昇し、このステップが大変有効であることが示された。

2-2 リシルエンドペプチダーゼによる LDC の断片化とアミノ酸配列分析

LDC の精製標品をリシルエンドペプチダーゼにより限定分解し、得られたペプチド断片のうち6本の内部アミノ酸配列を決定した (Fig. 6)。

第3章 LDC 遺伝子のクローニングおよび一次構造解析

第2章で決定したアミノ酸配列の情報をもとに、本章では LDC 遺伝子 (*ldc*) のクローニングを行い、*S. ruminantium* LDC の一次構造を解明した。

3-1 LDC 遺伝子のクローニング

LDC の N 末端および内部アミノ酸配列をもとに degenerate プライマーを作製し、*S. ruminantium* の染色体 DNA を鋳型として PCR を行った。まず、本酵素の N 末端側約 1/7 をコードする 152 bp の断片が得られ、さらにこの配列をもとにして 967 bp の断片を得た (Fig. 7)。これらの断片の推定アミノ酸配列中には、2-2 で決定した内部アミノ酸配列のすべてが含まれていた。967 bp の断片をプローブにした、*S. ruminantium* の各種制限酵素消化ゲノムとのサザンハイブリダイゼーションの結果を Fig. 8 に示した。約 3.9 kbp の *EcoR* I 消化断片を含むゲノムライブラリーを作製し、コロニーハイブリダイゼーションによるスクリーニングを 100,000 株以上行ったが、陽性クローンを得ることができなかった。このため *EcoR* I カセットを用いた PCR (Fig. 7) によって *ldc* を含む 3,858 bp の塩基配列を決定した (Fig. 9)。また、*ldc* のプロモーター領域について Primer Extension による解析を行い、プロモーターが2組あることを明らかにした (Fig. 10)。

3-2 本酵素と真核生物の ODC との相同性

本酵素の全長 393 残基の推定アミノ酸配列について相同検索を行ったところ、既知の細菌の LDC や ODC とではなく、真核生物の ODC と約 60% の相同性があることが判明した。一致するアミノ酸は約 40% あり、真核生物の ODC で活性中心の形成に重要なアミノ酸残基はすべて、本 LDC でも一致していた (Fig. 11)。1999 年に M. L. Hackert らによりマウス ODC の結晶構造が

明らかとされたが、本 LDC の二次構造予測を行ったところマウス ODC の二次構造と 67% 一致し、これら 2 つの酵素が高次構造においても類似していることが示唆された。

原核生物の LDC 及び ODC と真核生物の ODC とは、一次及び高次構造において大きく異なることが報告されている。しかし本研究で、進化の過程では原始的な位置にある偏性嫌気性細菌の本菌が真核型の酵素を有していることが明らかとなった。*S. ruminantium* が真核生物に近いことは、本菌の膜構成脂質にプラスマロゲンやグリセリルエーテル型リン脂質が含まれていることから示唆される。本研究室ではごく最近、*S. ruminantium* と同じくペプチドグリカンにポリアミンを有する *Veillonella parvula* においても真核型の酵素の存在を見出した（小野ら、未発表）。また、1999 年に超好熱菌の *Thermotoga maritima* の全ゲノム配列が報告されたが、この始原細胞に近い真正細菌にも真核型の ODC が存在している。これらの事実から、従来の原核型・真核型という ODC の分類の枠を越え、真正細菌の中に真核型の酵素をもつ一群のグループがあることが強く示唆される。

第 4 章 *S. ruminantium* LDC の基質特異性に寄与するアミノ酸残基の同定

第 3 章において、本酵素と真核生物の ODC はよく類似した構造を有することが示唆された。それにも拘わらず、本酵素はリジンとオルニチンの 2 つのアミノ酸を認識し、真核生物の ODC はオルニチンに高い特異性を示す。本章では、本酵素の 2 つのアミノ酸を認識する機能が、構造のどこに起因しているのかを解明することを目的として、*S. ruminantium* LDC の変異酵素を作製して基質特異性の変化を解析した。

4-1 本酵素の 2 つのアミノ酸を認識する活性中心が同一であることの証明

LDC および ODC にそれぞれ特異的かつ不可逆的な阻害剤であるジフルオロメチルリジン (DFML) とジフルオロメチルオルニチン (DFMO) を用い、リジンまたはオルニチンを基質としたときの本酵素に対する 2 つの阻害剤の阻害形式を Lineweaver-Burk プロットにより解析した (Fig. 12)。いずれの場合も拮抗的阻害であったことから、本酵素の 2 つのアミノ酸を認識する活性中心は同一であることが証明された。

4-2 *S. ruminantium* LDC の変異酵素の作製と基質特異性の変化の解析

真核生物の ODC のアミノ酸配列との比較から、マウス ODC における補酵素ピリドキサル磷酸 (PLP) の結合する K⁶⁹、基質アナログ阻害剤 DFMO の結合部位 C³⁶⁰、基質のアミノ基と相互作用する D³⁶¹ に一致し、いずれも基質との相互作用に最も重要と思われる本酵素の K⁵¹ および C³²³D³²⁴ 周辺で、両者のアミノ酸が異なる 3 つの領域 (Table 2, Box A, Box B, 及び Box C) に注目した。本酵素のそれぞれの Box において、マウス ODC のアミノ酸残基に置換する変異を導入し、変異酵素を大腸菌で発現させて菌体破碎液の ODC および LDC 活性を測定した。Box A と Box B については基質特異性に変化のあった 6 つの変異酵素を精製し、大腸菌で発現させたり

コンピナント LDC とともに反応速度のパラメーターを Lineweaver-Burk プロットにより解析した (Table 3)。Box A と B を組み合わせた 4 残基置換変異酵素 A44V/G45T/V46P/P54D は、野生型に比べオルニチンに対する特異性が 4.6 倍高まり、オルニチンを優先的に認識する酵素となった。

LDC 変異酵素の基質特異性に変化は見られたが、マウス ODC の厳密な基質認識には至っておらず、基質特異性と構造との関係の解明は本酵素の三次元構造の解明を含め、今後の研究課題である。

要 約

本研究では *S. ruminantium* の LDC について、活性の発現調節機構、酵素の精製、遺伝子の構造、及び 2 つのアミノ酸を認識する機能と構造に関して検討し、以下のことを明らかにした。

1. 菌体の生育に伴う LDC 活性の発現調節について、定常期初期に起こる活性の急激な低下は、酵素タンパク質の速やかな分解によることを明らかにした。
2. 本酵素の精製法に改良を加え、従来の 2 倍の収量を得られる、疎水クロマトグラフィーを基本とした新しい精製法を確立した。
3. 精製した LDC の N 末端および内部アミノ酸配列の情報をもとに、PCR 法により本酵素遺伝子を含む 3,858 bp の塩基配列を決定した。
4. 本酵素の全長 393 残基の推定アミノ酸配列は、既知の細菌の LDC や ODC とではなく、真核生物の ODC と約 60% の相同性を示した。さらに、真核生物の ODC において活性中心の形成に重要なアミノ酸残基は、本 LDC でもすべて一致していた。
5. 本酵素の補酵素 PLP 結合部位周辺の 4 アミノ酸残基 A44G45V46/P54 を、オルニチンに特異的なマウス ODC のアミノ酸残基 V62T63P64/D72 に置換することにより、変異酵素は野生型に比べオルニチンに対する特異性が 4.6 倍高まり、オルニチンを優先的に認識する酵素となった。

今後は、調節因子の探索を含む本酵素の発現制御機構の解明と、本酵素の三次元構造の解明に基づく基質認識機構と酵素高次構造との関係の解明が課題である。

原 著 論 文

- [1] Takatsuka, Y., Onoda, M., Sugiyama, T., Muramoto, K., Tomita, T., and Kamio, Y. (1999) Novel characteristics of *Selenomonas ruminantium* lysine decarboxylase capable of decarboxylating both L-lysine and L-ornithine. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 1063-1069.
- [2] Takatsuka, Y., Tomita, T., and Kamio, Y. (1999) Identification of the amino acid residues conferring substrate specificity upon *Selenomonas ruminantium* lysine decarboxylase (Preliminary Communication). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 1843-1846.

- [3] Takatsuka, Y., and Kamio, Y. (1999) Gene cloning and molecular characterization of lysine decarboxylase from *Selenomonas ruminantium* delineate its evolutionary relationship to ornithine decarboxylases from eukaryotes. *J. Biol. Chem.*, submitted.

参 考 論 文

- [1] Kikuchi, Y., Kojima, H., Tanaka, T., Takatsuka, Y., and Kamio, Y. (1997) Characterization of a second lysine decarboxylase isolated from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **179**, 4486-4492.
- [2] 神尾好是、高塚由美子 (1996) ルーメン内窒素代謝と生産性〔3〕 ルーメン細菌のペプチドグリカン結合ポリアミンとリジン脱炭酸酵素(総説). 畜産の研究, 50 (9), 1025-1030.

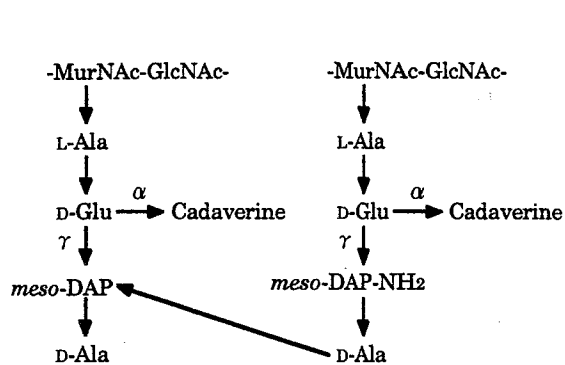


Fig. 1. Chemical structure of the cadaverine-containing peptidoglycan in *S. ruminantium*.

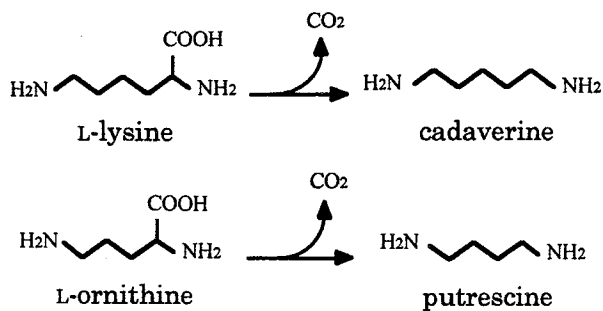


Fig. 2. Enzyme reaction of the LDC from *S. ruminantium*. The LDC of *S. ruminantium* is a bifunctional enzyme, which acts on both L-lysine and L-ornithine and converts them to cadaverine and putrescine, respectively.

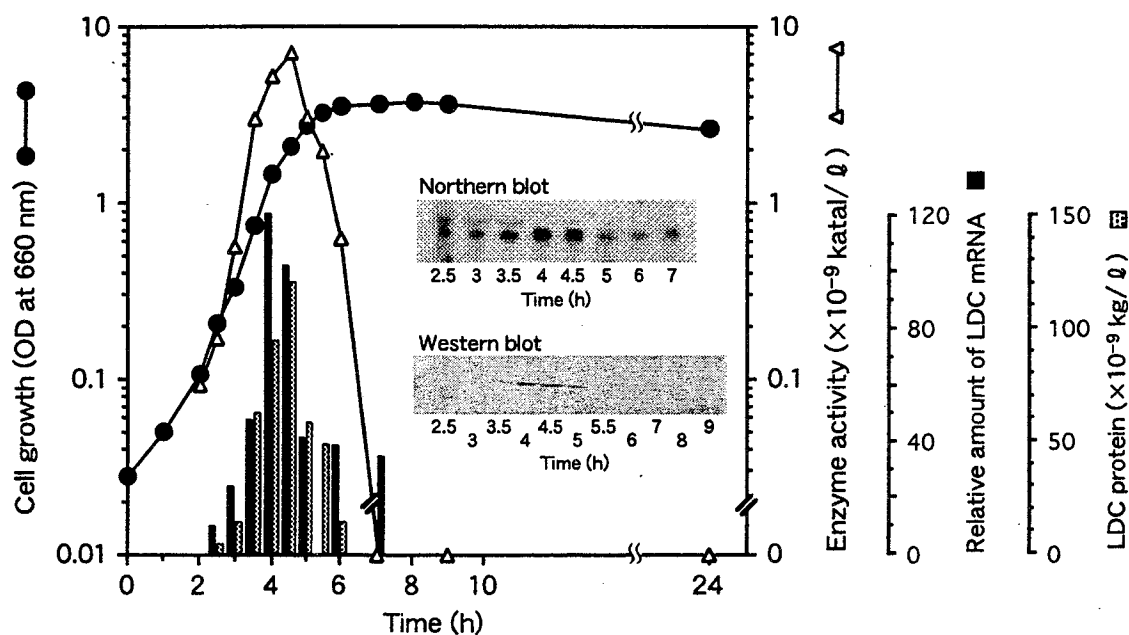


Fig. 3. Fluctuation in the LDC activity, the quantity of LDC, and mRNA for LDC during growth of *S. ruminantium*. One katal (kat) of enzyme activity was defined as 1 mol of cadaverine formed from L-lysine at 40°C in 1 second.

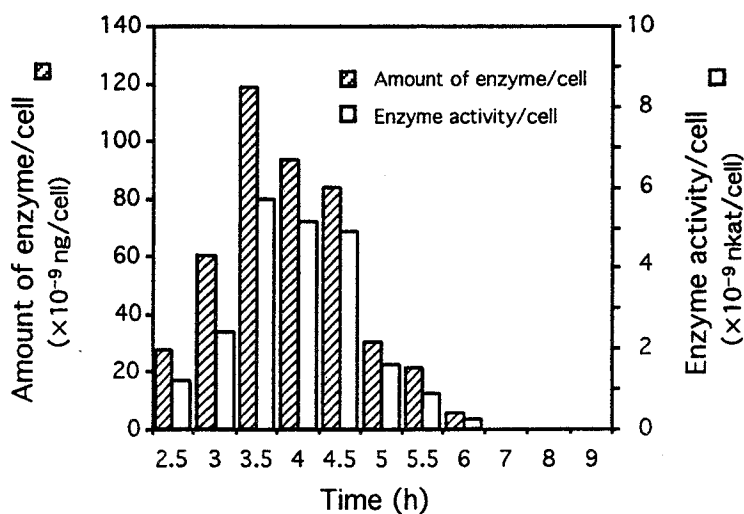


Fig. 4. Fluctuation in the quantity of LDC during growth of *S. ruminantium*.

Table 1. Purification of the lysine decarboxylase from *S. ruminantium*.

Purification steps	Total vol. (ml)	Total protein ($\times 10^{-6}$ kg)	LDC		Yield (%)	Purification (Fold)
			Total activity ($\times 10^{-9}$ kat)	Specific activity (kat/kg)		
Crude extract*	429	5990	1081	0.000181	100	1
Butyl-Toyopearl 650M	118	85.7	532	0.00621	49.2	34.5
Phenyl-5PW	15.8	2.59	141	0.0544	13.0	302
DEAE-5PW	2.75	0.531	105	0.198	9.71	1100
HA-1000	3.50	0.350	54.3	0.155	5.02	861

* Prepared from the cells of 60-liter culture (125.7g wet cells).

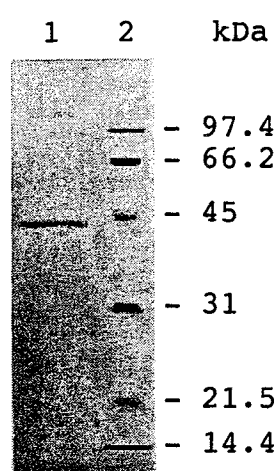


Fig. 5. SDS-PAGE analysis of the purified LDC from *S. ruminantium*.

1 : Purified LDC preparation.

2 : Molecular mass standards.

N-terminal	1	5	10	15
	Met-Lys-Asn-Phe-Arg-Leu-Ser-Glu-Lys-Glu-Val-Lys-Thr-Leu-Ala			
	16	20		
	-Lys-Arg-Ile-Pro-()-Pro-Phe-Leu-(Val)-			
# 20	1	5	10	
	-Arg-Ile-Pro-Thr-Pro-Phe-Leu-Val-Ala-Ser-Leu-Asp-			
# 13	1	5		
	-Val-Glu-Glu-Asn-Tyr-Gln-Phe-Met-			
# 23	1	5	10	
	-Gly-Ala-Pro-Val-Glu-Glu-Ala-Leu-Asp-Leu-Leu-(Ile)-			
# 24	1	5		
	-Val-Leu-Val-()-Glu-Met-Gly-Ser-Tyr-			
# 30	1	5	10	15
	-Thr-Arg-Gly-Glu-Glu-Pro-Ser-Tyr-Ile-Leu-Asp-Glu-Gly-Thr-Ile/Tyr-			
# 31	1	5	10	
	-Ala-Asn-Pro-Thr-Pro-Glu-Ile-Leu-Ser-Met/Leu-Gly/Leu-Ala/Ile-Gly-			

Fig. 6. The N-terminal and internal amino acid sequences of the LDC from *S. ruminantium*.

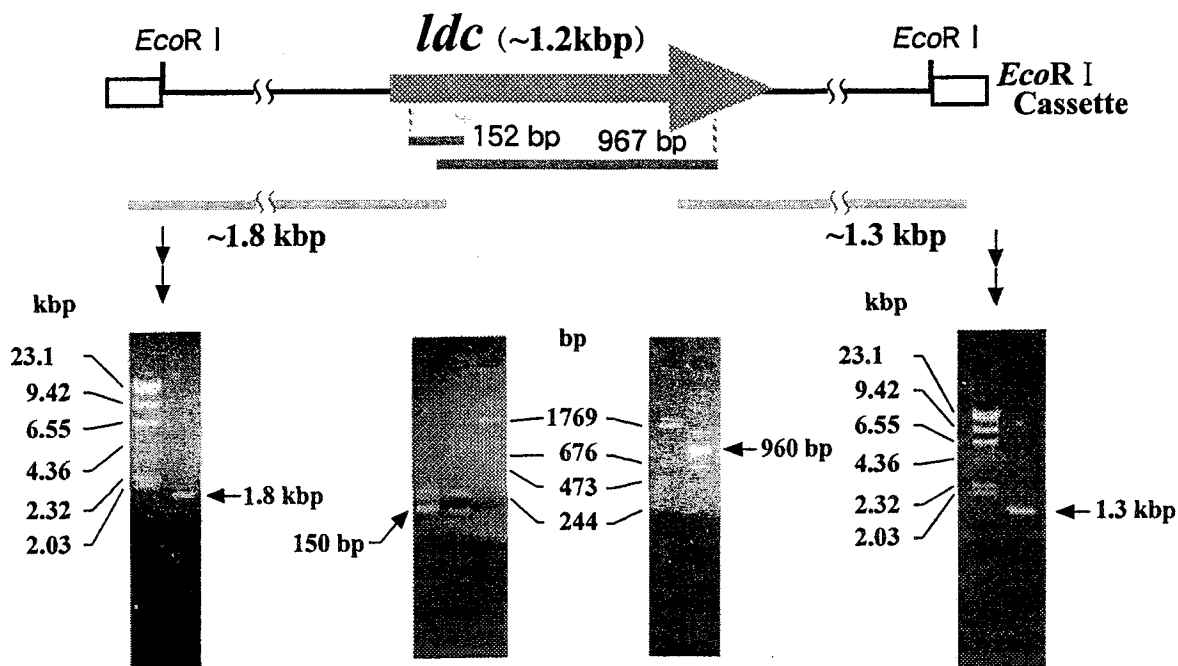


Fig. 7. Sequencing strategy for LDC gene using *EcoR* I cassette and the PCR products from chromosomal DNA of *S. ruminantium*.

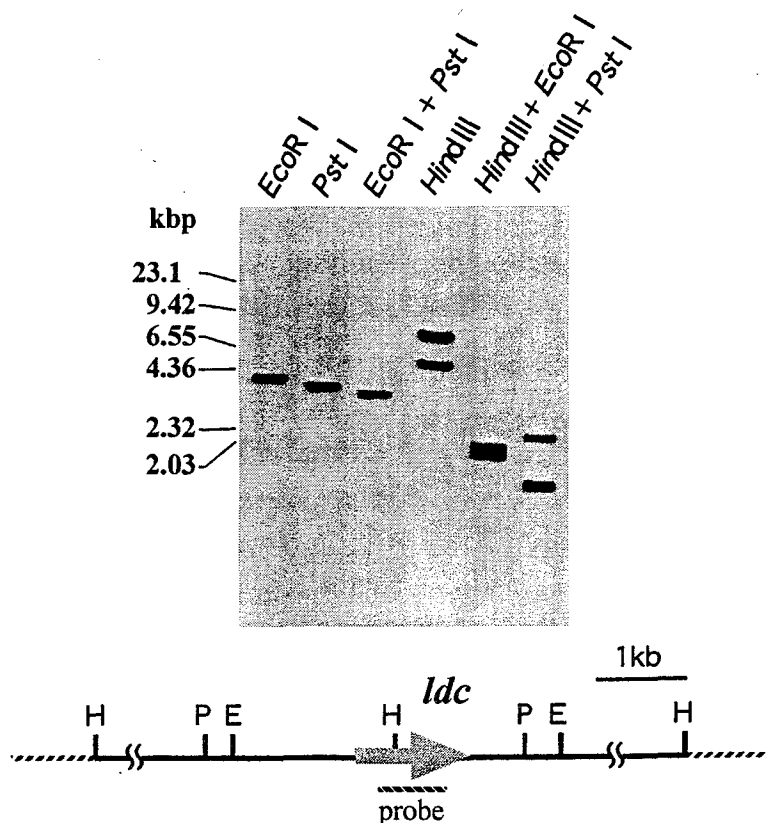


Fig. 8. Southern blot analysis of the genomic DNA from *S. ruminantium* with the cloned DNA probe and restriction map of lysine decarboxylase gene.

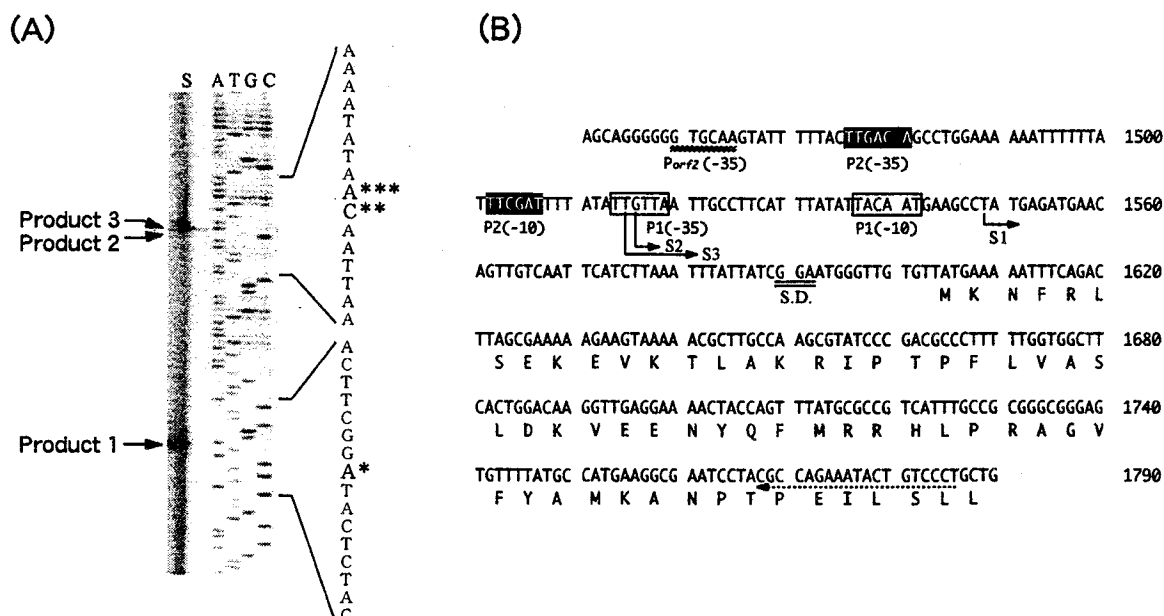


Fig. 10. Determination of the transcription start site for *ldc* by primer extension, using a 19 mer complementary to nt 1768 to 1786, counting from the *EcoRI* site of chromosomal DNA of *S. ruminantium* sequenced. The RNA preparation (30 μ g) extracted from the cells of 3 h-cultivation was used for primer extension. Panel A (lane S) shows gel electrophoresis of the primer extension products (Product 1, Product 2, and Product 3). The sequence shown next to the sequencing gel is complementary to that displayed in panel B. The single, double and triple asterisks indicate the bases complementary to the 5' end of the transcript for S1, S2, and S3, respectively. Panel B presents the nucleotide sequence (nt 1451 to 1790) containing the putative promoter site (-35 region) for ORF 2 and the beginning of *ldc*. The dashed arrow indicates the region complementary to the primer used. The transcription start sites (T, G, and T) determined here (nt 1558, 1516 and 1515) are indicated by S1, S2, and S3.

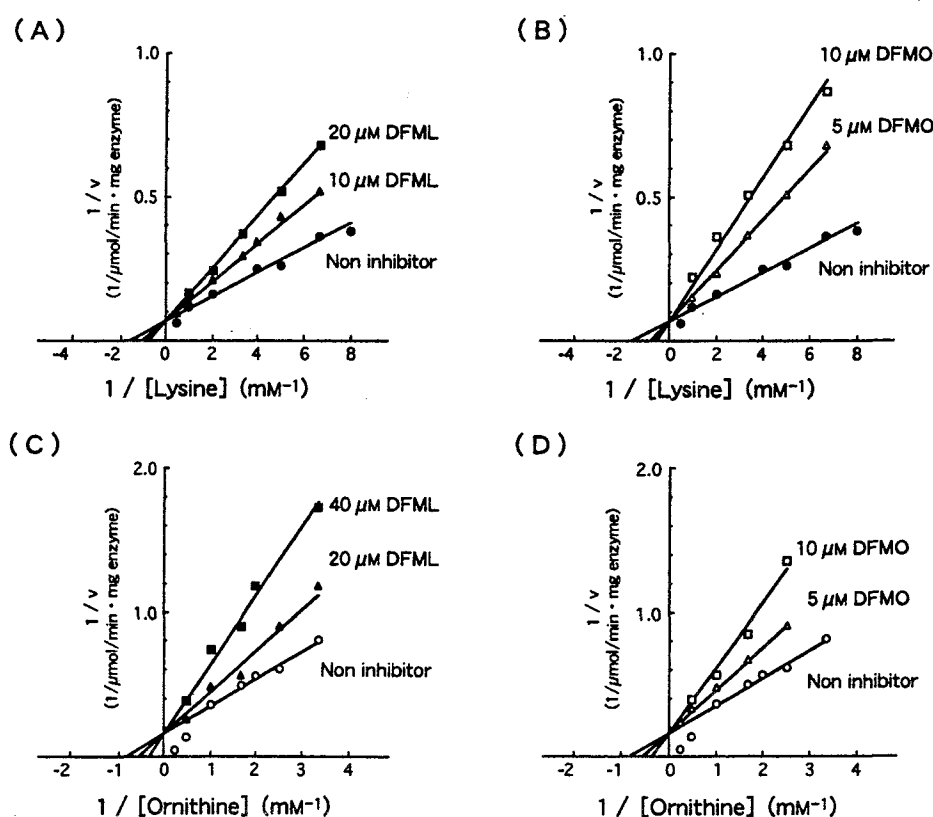


Fig. 12. Lineweaver-Burk plots of lysine decarboxylase (A, B) and ornithine decarboxylase (C, D) activities of the purified LDC preparation with or without inhibitors. Inhibitors; DFML and DFMO were used for A and C, and B and D, respectively.

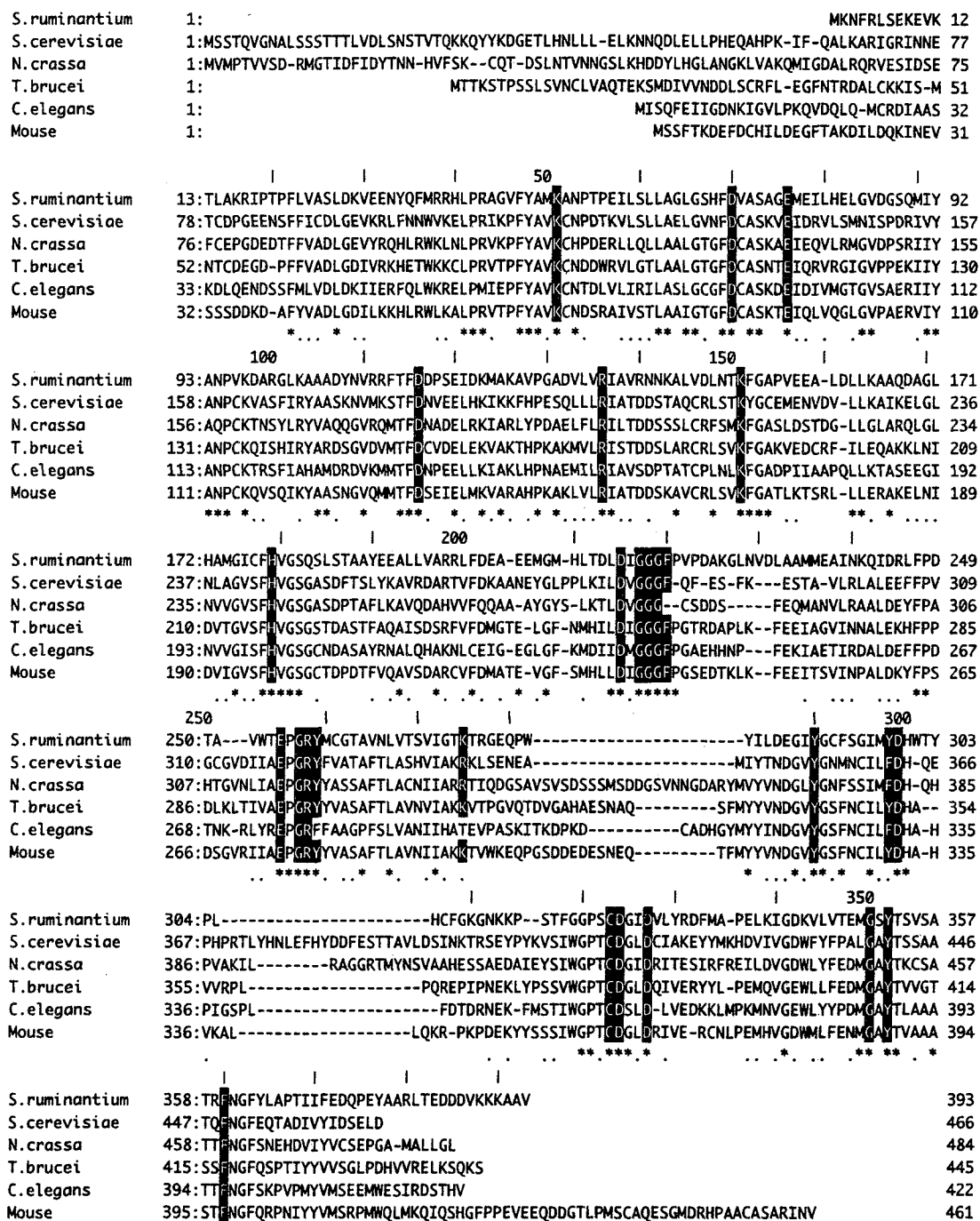


Fig. 11. Amino acid sequence alignment of the LDC from *S. ruminantium* with the ornithine decarboxylases of various eucaryotes. The LDC of *S. ruminantium* exhibit similarity (60%) to eukaryotic ornithine decarboxylases (ODCs) including ODC of *Saccharomyces cerevisiae*, *Neurospora crassa*, *Trypanosoma brucei*, *Caenorhabditis elegans*, and Mouse. There is no homology between LDC of *S. ruminantium* and the other bacterial LDCs and ODCs. The consensus line displayed below the aligned sequences depicts identical amino acids as asterisks, with conserved residues shown as dots. Amino acids required for formation of the active site of ODCs are boxed.

Table 2. Comparison of the amino acid sequences conferring the substrate specificity upon eukaryote ODCs or *S. ruminantium* LDC. Amino acid residues required for formation of the active site of mouse ODC are shaded.

Region I														
Enzyme	Residue number													
	41			46			51			55				
				Box A						Box B				
Mouse ODC	L	P	R	V ⁶²	T ⁶³	P ⁶⁴	F	Y	A	V ⁶⁸	K ⁶⁹	C ⁷⁰	N	D ⁷² S ⁷³
<i>S. ruminantium</i> LDC	L	P	R	A ⁴⁴	G ⁴⁵	V ⁴⁶	F	Y	A	M ⁵⁰	K ⁵¹	A ⁵²	N	P ⁵⁴ T ⁵⁵

Region II												
Enzyme	Residue number											
	316			321			326					
				Box C								
Mouse ODC	S	S	I ³⁵⁵	W ³⁵⁶	G	P	T ³⁵⁹	C ³⁶⁰	D ³⁶¹	G	L ³⁶³	D ³⁶⁴
<i>S. ruminantium</i> LDC	S	T	F ³¹⁸	G ³¹⁹	G	P	S ³²²	C ³²³	D ³²⁴	G	I ³²⁶	D ³²⁷

Table 3. Kinetic parameters for the decarboxylation of lysine and ornithine by wild type and mutant LDCs and mouse ODC.

Enzyme	K_m		k_{cat}		k_{cat}/K_m		Substrate specificity
	lysine	ornithine	lysine	ornithine	lysine	ornithine	
	mM		s^{-1}		$M^{-1} s^{-1}$		
Mouse ODC*	5.2	0.090	1.8	7.8	350	87000	250
Wild type rLDC	1.5	0.96	16	8.6	11000	8900	0.83
A44V/G45T/V46P	3.0	0.98	13	8.4	4300	8600	2.0
A52C	1.9	1.3	10	7.0	5500	5500	1.0
P54D	5.7	2.1	16	13	2900	6300	2.2
A52C/P54D	2.4	1.6	6.8	7.2	2900	4500	1.6
M50V/A52C/P54D/T55S	3.6	4.5	2.6	4.7	700	1000	1.5
A44V/G45T/V46P/P54D	8.0	3.1	9.8	14	1200	4700	3.8

Each reaction was carried out in 0.5 M sodium acetate buffer containing 50 μ M PLP and 0.1% CHAPS, pH 6.0, at 30°C. The substrate specificity was defined as the ratio of k_{cat}/K_m value with ornithine relative to that with lysine as substrate.

*Ref : A. L. Osterman *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **270**, 11797-11802 (1995).

論文審査結果要旨

ヒツジのルーメン内から単離されたグラム陰性の偏性嫌気性細菌*Selenomonas ruminantium*のペプチドグリカンには、ジアミンの一種であるカダベリンが共有結合しており、外膜の安定化ならびに細胞分裂に重要な役割を演じている。カダベリンを合成するリジン脱炭酸酵素(LDC)は、一般に酸性条件やリジンによる誘導酵素として知られていたが、本菌のLDCは構成的な酵素であり、分子量などの物理化学的性質も既知のLDCとは異なっている。さらに、本酵素はリジンだけでなくオルニチンも基質として認識し、プトレシンを生成する機能も有しており、現在報告されているアミノ酸脱炭酸酵素の中では2つのアミノ酸に同程度に作用する唯一の酵素である。これらの特徴から、本LDCは他の細菌のものとは進化的な起源が異なる新規の酵素であることが期待されていた。

本研究において、本研究者は以下の事項を明らかにした。(1)まず、煩雑であった本酵素の従来の精製法に改良を加えて新しい精製法を確立し、2倍の収量で得たLDCの精製標品を用いてN末端および内部アミノ酸配列を決定した。(2)得られたアミノ酸配列の情報をもとにPCRによって本酵素遺伝子を含む3,858bpの塩基配列を決定し、その特性と本酵素の一次構造を明らかにした。(3)本酵素の推定アミノ酸配列393残基は、既知の細菌の酵素とではなく、真核生物のオルニチン脱炭酸酵素(ODC)と約60%の相同性を有し、活性中心形成に重要なアミノ酸残基もすべて一致していることが判明した。細菌における真核型ODC様酵素の存在の報告はこれが初めてであるが、全ゲノム配列が報告されている2種の好熱細菌を含め、真正細菌の中に真核型の酵素を持つ一群があることが示唆された。(4)菌体の生育に伴うLDC活性の厳密な発現調節について、酵素タンパク質量およびmRNA量の変動をWesternおよびNorthern blotにより解析し、定常期初期に起こる活性の急激な低下が、酵素タンパク質の速やかな分解によることを明らかにした。(5)本酵素とオルニチンに高い特異性を示す真核生物のODCのアミノ酸配列の比較から、本酵素のリジンとオルニチンの識別に関わるアミノ酸残基を推定し、部位特異的変異法によりLDC変異酵素を作製して基質特異性の変化を解析した。補酵素結合部位周辺の4アミノ酸残基A44G45V46/P54を、マウスODCのアミノ酸残基V62T63P64/D72に置換することで、野生型に比べてオルニチンに対する特異性が4.6倍高まった、オルニチンを優先的に認識する変異酵素の作成に成功した。

以上のように本研究は、*S.ruminantium* LDCの遺伝子の構造を解明し、本酵素の活性発現調節機構、及び2つのアミノ酸を認識する機能と構造に関して検討したものであり、審査員一同は、本研究者に博士(農学)の学位を授与するのに値するものと認定した。